

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590161

研究課題名(和文)多様性に富むHIVの弱点を突くPTMを標的とする新しい抗HIV戦略構築研究

研究課題名(英文)Study to develop novel anti-HIV strategy targeting to weak point of HIV life cycle

研究代表者

高宗 暢暁 (TAKAMUNE, NOBUTOKI)

熊本大学・イノベーション推進機構・准教授

研究者番号：60322749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHIV複製に密接に関わることが知られているNMT1に着目し、NMT1と相互作用するタンパク質を探索した。その結果NMT1がhnRNP A2/B1とRNAを介さずに結合することを見いだした。興味深いことに、NMT1はHIV RNAの発現レベルの上昇に関与し、一方hnRNP A2/B1はHIV RNAの発現レベルの低下に関与していることが明らかになった。NMT1はHIV由来タンパク質(Gagタンパク質とNef)のNミリスチル化触媒酵素として、HIV複製に必須の宿主性因子として機能しているだけでなく、HIV RNAの発現レベルの上昇にも関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated NMT1-binding proteins using co-immunoprecipitation and mass spectrometry. Interestingly, hnRNP A2/B1 was found to be associated with NMT1, which was not mediated by RNA. It was also suggested that hnRNP A2/B1 contributes to the formation of complexes of high molecular weights involving NMT1. Knockdown of hnRNP A2/B1 resulted in the enhancement of viral replication with an increase in the expression level of viral RNA in HIV-1-producing cells. On the other hand, knockdown of NMT1 resulted in attenuation of the viral replication with the decrease in the expression level of viral RNA in HIV-1-producing cells. Additionally, overexpression of NMT1 induced the enhancement of viral replication with the increase in the expression level of the viral RNA. These findings suggest that both NMT1 and hnRNP A2/B1 take part in the regulation of HIV-1 RNA expression through their mutual reverse effects on the viral RNA expression in HIV-1-producing cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HIV

研究分野：医歯薬学

キーワード：HIV

1. 研究開始当初の背景

(1) N-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT)はタンパク質の N ミリスチル化の触媒酵素である。NMT は細胞質とリボソームに局在していることが知られ、NMT のアミノ末端領域に存在する塩基性アミノ酸リッチな配列がリボソーム局在に重要であり、リボソームで翻訳中の基質タンパク質のアミノ末端を N ミリスチル化する。N ミリスチル化は主としてミリスチル化タンパク質の膜局在に重要な役割を果たす。

(2) HIV-1 の構造タンパク質の前駆体タンパク質である Pr55^{gag} のアミノ末端 Gly 残基は N ミリスチル化を受ける。この N ミリスチル化は HIV 複製に必須の翻訳後修飾である。N ミリスチル化を受けない変異は 1 アミノ酸置換で達成されるが、この変異を導入すると、HIV は完全に複製できなくなる。HIV タンパク質でアクセサリタンパク質である Nef は多様な機能を有していることが知られ HIV の病原性に関与していることが知られているが、Nef もまた N ミリスチル化を受け、N ミリスチル化を受けない変異を導入した Nef はその全ての機能を失うことが知られている。

(3) ヒトにおける NMT には、NMT1 と NMT2 の 2 つのパラログが存在していることが知られている。これまでの研究代表者らの研究で、NMT1 が HIV の複製に重要であることが明らかになっていた。siRNA による NMT1 のノックダウンで少なくとも HIV の Pr55^{gag} の膜局在に異常が観察されたことから、NMT1 による Pr55^{gag} のミリスチル化への寄与が考えられたが、HIV 複製に NMT1 がどのように関与しているのかその詳細はまだ明確では無かった。

(4) Nef の翻訳後修飾に関して、N ミリスチル化を受けるだけでなく、リン酸化を受けることが知られているが、リン酸化部位やその意義についての詳細については明確になっていない。

2. 研究の目的

(1) NMT1 の HIV 複製へどのように関与しているのかを解明するため、NMT1 と特異的に相互作用するタンパク質を探索し、相互作用タンパク質と NMT1 や HIV 複製と関係性を明らかにすることで、NMT1 の HIV 複製への関与を解明する。

(2) プロテインキナーゼ C の活性化に伴う Nef のリン酸化についての詳細を検討する。

3. 研究の方法

(1) His-tag 付 NMT1 を安定的に発現する HEK293/His-tagged NMT1 細胞を構築した。その細胞を大量培養し、細胞を回収後、細胞を可溶化し抗 His tag 抗体結合ビーズを用いて NMT1 を免疫沈降法により回収した。免疫複合体を 6x His ペプチドで溶出した。細胞を可溶化する時点で核酸を分解するためにヌクレアーゼ処理を行い、RNA を介して NMT1 と相互作用しているタンパク質を除去した条件も同時に行った。NMT1 に特異的に結合しているタンパク質を質量分析による MS/MS 解析により同定した。

(2) RNA を介せずに NMT1 と相互作用しているタンパク質であった hnRNP A2/B1 を siRNA でノックダウンし、このときの HIV Pr55^{gag} の N ミリスチル化について click chemistry 法により評価した。

(3) hnRNP A2/B1 の siRNA によるノックダウンの HIV 複製に与える影響を p24ELISA および HIV 感染インジケータ細胞である Tzmb1 細胞を用いた感染系によって評価した。

(4) hnRNP A2/B1 または NMT1 の siRNA によるノックダウンの HIV RNA 発現レベルに与える影響、NMT1 の過剰発現の HIV RNA 発現レベルに与える影響を調べた。HIV RNA レベルは qPCR 法を用いた。また HIV タンパク質レベルについては western immunoblot 法にて評価した。

(5) Nef のリン酸化解析は 2 次元電気泳動法と質量分析により解析した。Nef リン酸化を受けない変異体を作成しその変異の HIV 複製への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) HEK293/His-tagged NMT1 細胞を大量培養し細胞を回収後、抗 His-tag 抗体結合ビーズを利用し、His-tagged NMT1 の免疫沈降を行った。免疫複合体は 6 x His ペプチドで溶出した。得られたサンプルを SDS-PAGE により分離展開し銀染色法によりタンパク質染色した。その結果、コントロール細胞と比較して、特異的に His-tagged NMT1 に結合したタンパク質群を認めた。特異的なタンパク質を質量分析による MS/MS 解析で同定した結果、6 個のリボソームタンパク質(L4, L12, L19, L24, S16, 及び S24)及び内在性 NMT1 と NMT2、さらに hnRNP A2/B1 を同定した。NMT1 はそのアミノ末端側に存在する塩基性アミノ酸リッチ領域である K box を介してリボソームに局在できることが明らかになっているので、共沈したリボソームタンパク質や内在性 NMT アイソザイムはリボソームや mRNA を介して His-tagged NMT1 と相互作用していることが考えられた。このことを検証するため、HEK293/His-tagged NMT1 細胞を可溶化後、ヌクレアーゼ処理し RNA を含む核酸を分解後、His-tag 抗体結合ビーズにより同様に免疫沈

降を行い結合タンパク質を調べた。その結果 hnRNP A2/B1 のみ共沈した。以上の結果から、NMT1 がリボソームタンパク質やリボソームタンパク質と RNA 分子を介して相互作用していることが示され、また興味深いことに hnRNP A2/B1 は RNA を介さずに NMT1 と直接結合していることが示唆された。

(2) hnRNP A2/B1 と NMT1 による HIV Pr55^{gag} の N ミリスチル化との関連について検討するために、hnRNP A2/B1 をノックダウンした細胞における HIV Pr55^{gag} のミリスチル化の評価を行った。ここでは Click chemistry を利用し N ミリスチル化の検出を行った。その結果、hnRNP A2/B1 をノックダウンすると Pr55^{gag} の見かけの N ミリスチル化レベルがコントロールと比較して上昇していた。このとき Pr55^{gag} のタンパク質を western immunoblot 法により検出した結果、Pr55^{gag} タンパク質の発現レベルがコントロールと比較して上昇していた。以上の結果から、hnRNP A2/B1 のノックダウンによる見かけの Pr55^{gag} の N ミリスチル化レベルの上昇は Pr55^{gag} タンパク質レベルの上昇によることが明らかになった。hnRNP A2/B1 は NMT1 による Pr55^{gag} の N ミリスチル化とは関連しないと結論づけられた。

(3) hnRNP A2/B1 のノックダウンにより Pr55^{gag} 発現レベルの上昇が観察されたことから、hnRNP A2/B1 と HIV 複製との関連について検討した。その結果、hnRNP A2/B1 をノックダウンすることで HIV 産生の増強や HIV 感染性の上昇が認められた。hnRNP A2/B1 ノックダウンにより HIV RNA レベルの上昇が観察された。このことから少なくとも hnRNP A2/B1 は HIV ライフサイクルの後期過程において HIV RNA 発現レベルを負に作用させる機能を有していることが考えられた。

(4) hnRNP A2/B1 と相互作用する NMT1 が HIV RNA レベルにどのような影響を与えるのかを検討するため、NMT1 のノックダウン及び NMT1 過剰発現細胞における HIV RNA レベルを評価した。その結果、興味深いことに NMT1 ノックダウンで HIV RNA レベルが有意に低下し、NMT1 過剰発現で HIV RNA レベルが有意に上昇した。この NMT1 の HIV RNA レベルに対する作用は hnRNP A2/B1 のそれに対する作用と逆の作用であった。

(5) 本研究では、翻訳後修飾酵素である NMT1 が HIV 複製において HIV RNA レベルに正に作用する機能を有していることが示唆された。その詳細な機構についてはまだ不明であるが、HIV RNA レベルを負に作用する hnRNP A2/B1 と NMT1 が相互作用することから、NMT1 と hnRNP A2/B1 が関連しあうことで HIV RNA レベルを制御している仮説が考えられた。まとめると、少なくとも NMT1 は HIV 複製にお

いて、Pr55^{gag} 等のウイルスタンパク質の N ミリスチル化を介してポジティブに關与しうだけでなく、HIV RNA レベルを上昇させる作用に關与することでもポジティブに作用していることが示唆された。今後この仮説を検証するために、NMT1 の HIV RNA に対する作用について詳細な解析が必要になる。

(6) また本研究では、Nef のリン酸化についての諸検討を行った。ホルボールエステルによりプロテインキナーゼ C(PKC)を活性化すると Nef がリン酸化されることが明らかになった。このリン酸化には Nef の N ミリスチル化が必要とされた。また HIV 株によって PKC 活性化を介した Nef のリン酸化数が異なっていることが明らかになった。Nef のリン酸化部位の同定を試みた結果、少なくとも 2 カ所のリン酸化サイトを同定した。今後、この PKC 活性化を伴う Nef のリン酸化の HIV 複製における意義、さらに HIV 株によって異なる Nef のリン酸化数の違いが HIV 複製においてどのような意義が有るのか等の解明が必要になる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Harada K, Takamune N, Shoji S, Misumi S. Clearly different mechanisms of enhancement of short-lived Nef-mediated viral infectivity between SIV and HIV-1. *Virology*. 査読有り、Vol.11、p222、2014

Yamamoto M, Harada K, Shoji S, Misumi S, Takamune N. Identification of Essential cis Element in 5'UTR of Nef mRNA for Nef Translation. *Curr. HIV Res.* 査読有り、Vol. 12、p213、2014

Dochi T, Nakano T, Inoue M, Takamune N, Shoji S, Sano K, Misumi S. Phosphorylation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) capsid protein at serine 16, required for peptidyl-prolyl isomerase (Pin1)-dependent uncoating, is mediated by virion-incorporated extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J. Gen. Virol.* 査読有り、Vol.95、p1156、2014

[学会発表](計 5 件)

長峰 啓志郎、高宗 暢暁、庄司 省三、三隅 将吾、Nef mRNA の 5'UTR に存在するその効率的な翻訳に必須となる cis 領域、第 87 回 日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日、京都国際会議場(京都府・京都市)

太田 光、高宗 暢暁、庄司 省三、三

隅 将吾、N-ミリストイルトランスフェラーゼに関する研究、第30回 日本薬学会九州支部大会、2013年12月7日、長崎国際大学(長崎県・佐世保市)

高宗暢暁、山本充奈美、原田圭輔、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIVアクセサリー遺伝子産物 Nef の翻訳機構に関する研究、第86回日本生化学会大会、2013年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

太田 光、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司省三、三隅 将吾、N-ミリストイルトランスフェラーゼ相互作用分子の探索、第86回日本生化学会大会、2013年9月12日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

太田 光、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三、三隅 将吾、HIV複製に必須の宿主因子 NMT に関する研究、平成24年度 日本生化学会支部例会、2012年5月26日、福岡大学(福岡県・福岡市)

〔その他〕

連携先のホームページの URL

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/emhs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宗暢暁 (TAKAMUNE, Nobutoki)

熊本大学・イノベーション推進機構・准教授

研究者番号：60322749